

Nowe markery prognostyczne przewlekłej białaczki limfocytowej badane metodą immunofenotypizacji

New prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia diagnosed using an immunophenotypic method

Małgorzata Krawczyk-Kuliś, Joanna Dziachowska-Suszek, Aleksandra Bartkowska-Chrobok, Sławomira Kyrz-Krzemień

STRESZCZENIE

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest klonalną chorobą limfoproliferacyjną charakteryzującą się namnażaniem i nagromadzeniem w krwi, szpiku oraz innych tkankach małych limfocytów B z koekspresją antygenu CD5. O rozpoznaniu PBL decydują standardowe kryteria, natomiast dla ustalenia strategii leczenia pomocne są tzw. czynniki prognostyczne. Niektóre z nich są powszechnie stosowane, ale wraz z postępem badań poszukuje się nowych czynników rokowniczych.

Materiał i metoda: U 43 pacjentów, uprzednio nieleczonych, metodą cytometrii przepływowej zbadano częstość występowania na komórkach PBL molekuł adhezyjnych CD49d, CD11c, CD54. Dla określenia ich znaczenia, jako czynników prognostycznych, skorelowano ich ekspresję z: stopniem zaawansowania wg Rai, ekspresją CD38 i ZAP-70 oraz aberracjami cytogenetycznymi.

Wyniki: stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD38 i CD49d oraz pomiędzy ZAP-70 i CD49d na komórkach PBL. Wykazano, że 85,7% pacjentów CD11c(+) było ZAP-70(+). Ponadto stwierdzono znamienne większą częstość występowania na komórkach białaczkowych CD49d w grupie chorych w stadium Rai III/IV vs 0/II. Nie wykazano korelacji pomiędzy liczbą komórek z ekspresją antygenów CD11c i CD54 a stopniem zaawansowania Rai i CD38. Nie wykazano także korelacji pomiędzy ekspresją CD54 a ekspresją ZAP-70. W grupie pacjentów CD38(-) i równocześnie CD49d(+) i/lub CD11c(+) aż 90,9% było ZAP-70(+).

Wnioski:

1. Częstość występowania ekspresji CD49d koreluje z klinicznymi (Rai) i fenotypowymi (CD38, ZAP-70) czynnikami ryzyka.
2. Uzasadnionym jest kontynuowanie badań antygenu CD11c jako potencjalnego czynnika prognostycznego, gdyż stwierdzono, że 86% przypadków CD11c+ wykazuje dodatnią ekspresję ZAP-70.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa, czynniki rokownicze, cytometria przepływowa

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clonal lymphoproliferative disease which is characterized by proliferation and accumulation in blood, bone marrow and other tissues, small B-derived cells accompanied by coexpression of CD5 antigen. Diagnosis of CLL shall be based on standard criteria, but at the same time in determining the treatment strategies some prognostic factors will be helpful. Some of them are widely known and used, but with the progress of research, looking for new prognostic factors is useful for improving the strategy.

Material and Methods: In 43 patients, previously untreated, studies were performed by flow-cytometry to determine the prevalence of antigen CD49d, CD11c, CD54 on CLL cells. To determine their significance as prognostic factors correlation of their expression with the recognized

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 11.01.2012
Zaakceptowano: 18.04.2012

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik:
Prof. dr hab. n.med. Sławomira Kyrz-Krzemień

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:
Dr hab. n.med. Małgorzata Krawczyk-Kuliś
Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Śląskiego Uniwersytetu w Katowicach
ul. Dąbrowskiego 25
40-032 Katowice
e-mail: kulism@interia.pl

Finansowanie/Finacial Suport
Praca naukowa finansowana za środków przeznaczonych
na badanie statutowe nr KNW-1-052/10 Śląskiego
Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (3): 271–276

standard prognostic factors, such as Rai stage, expression of CD38 and ZAP-70 as well as the presence of cytogenetic changes were done.

Results: In our studies, a positive correlation between the expression of CD38 and CD49d, and ZAP-70 and CD49d on CLL cells were found. It was shown that among patients with CD11c + up 85.7% there were ZAP-70 positive. In addition, a significantly higher incidence of leukemic cells CD49d+ antigen was present in patients in Rai stage III / IV vs. 0/ II. There were no correlations between the number of cells expressing the antigens CD 11c and CD54 and the degree of advancement of Rai and expression of CD38. We also showed no correlation between the expression of CD54 and the expression of ZAP-70 either. In the group of patients CD38 (–), alternatively CD49d (+) and / or CD11c (+) up to 90.9% there were ZAP-70 (+).

Conclusions:

1. Frequency of the incidence of the expression of CD49d correlates with clinical (Rai stage system) and/or risk factors determined by immunophenotype methods (CD38, ZAP-70).
2. There is a rationale to continue CD11c antigen estimation as a potential prognostic factor based on our results that 86% of CD11c+ cases presented ZAP-70 positivity.

Key words: Chronic lymphocytic leukemia, Prognostic factors, Flow cytometry

Wstęp

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest klonalną chorobą limfoproliferacyjną, która cechuje się proliferacją i nagromadzeniem małych, dojrzałych morfologicznie, ale niesprawnych czynnościowo limfocytów B we krwi obwodowej, szpiku kostnym, węzłach chłonnych, śledzionie i wątrobie. Chorzy z PBL stanowią heterogenną grupę kliniczną, różniącą się dynamiką przebiegu choroby, czasem przeżycia i odpowiedzią na leczenie. Poszukiwanie nowych czynników rokowniczych w PBL umożliwiających ulepszenie strategii leczenia, optymalne monitorowanie kliniczne, a także wypracowanie nowych strategii terapeutycznych jest obecnie przedmiotem wielu doniesień naukowych. Prowadzone są badania oceniające przydatność poszczególnych czynników pełniących kluczowe funkcje w kontroli przeżycia i aktywności limfocytów B oraz regulacji homeostazy całej populacji limfocytów B [1, 2]. Uważa się, że najważniejszą grupą czynników prognostycznych są aberracje chromosomalne [3] wykrywane głównie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Obecność del(11q) i del(17p13) jest związana z dużą masą nowotworu, progresywnością choroby, atypową morfologią limfocytów i krótkim całkowitym przeżyciem chorych. Aberracje te dodatkowo związane są z opornością na leki alkilujące i analogi puryn, wg niektórych autorów, za wyjątkiem kladrybiny [4]. Zmiany w zakresie długiego ramienia chromosomu 13 (13q14) charakteryzują PBL o korzystnym rokowaniu (dłuższe przeżycie całkowite i dłuższy czas wolny od leczenia). Szeregu innych czynników mających udowodnioną wartość prognostyczną nie analizuje się ru-

tynowo w codziennej praktyce klinicznej ze względu na wysokie koszty badania, brak standaryzacji metody lub też z powodu braku ich bezpośredniego wpływu na decyzje terapeutyczne. Do tej grupy wskaźników zaliczane są: stężenie β_2 -mikroglobuliny, aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), rozpuszczalne CD23, aktywność kinazy tymidynowej, ekspresja CD38, ZAP-70 i obecność mutacji somatycznych genów kodujących region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobulin (IgV_H) [5]. W obrębie klonu białaczkowego brak mutacji IgV_H stanowi jeden z najważniejszych wskaźników gorszego rokowania co do całkowitego przeżycia oraz czasu wolnego od progresji u chorych [6–9]. Metoda oznaczania stanu mutacji IgV_H ma jednak znaczne ograniczenia ze względu na wysoki koszt badania oraz wysoki stopień skomplikowania. Badanie to jest dostępne wyłącznie w wyspecjalizowanych ośrodkach. Powody te stały się przyczyną znalezienia „zastępczych” czynników, których metody oznaczania są szerzej dostępne w codziennej praktyce klinicznej. Należą do nich badania kinazy ZAP-70 i CD38. Wykazano silny związek (ok. 90% zgodności) pomiędzy występowaniem podwyższonej ekspresji ZAP-70 a obecnością mutacji somatycznych [10]. Podwyższona ekspresja ZAP-70 jest silnym predyktorem złego rokowania, głównie co do czasu wolnego od progresji i czasu całkowitego przeżycia [10, 11]. Podwyższona ekspresja antygenu CD38 (powyżej poziomu 30%) wiąże się również ze złym rokowaniem chorych na PBL. Wykazano korelację pomiędzy podwyższoną ekspresją CD38 a występowaniem ZAP-70 i mutacji IgV_H . Czynniki te, jeżeli występują łącznie, mają silniejsze zna-

czenie prognostyczne ze względu na ich związek czynnościowy [7, 12]. Dane o stanie mutacji somatycznej, ekspresji ZAP-70 i CD38 pozwalają na stratyfikację chorych według czynników rokowniczych. W praktyce klinicznej najczęściej powszechnie dostępną i używaną metodą w diagnostyce, różnicowaniu oraz ocenie czynników prognostycznych PBL jest immunofenotypowa metoda oceny komórek białaczkowych. Molekuły adhezyjne, jako białka wykazujące ekspresję błonową, również bada się metodą immunofenotypizacji. Biorąc pod uwagę potencjalne znaczenie molekuł adhezyjnych jako czynników prognostycznych, uznano za celowe sprawdzenie przydatności ich oznaczania w ocenie komórek PBL.

W przeprowadzonym badaniu oceniono częstość występowania powyżej poziomu 30% ekspresji cząstek z rodziny molekuł adhezyjnych: CD49d, CD11c oraz CD54 na komórkach białaczkowych PBL i porównano ją z ekspresją uznanych immunofenotypowych czynników o udowodnionym znaczeniu prognostycznym: antygenu CD38 i ZAP-70.

Material i metody

Pacjenci

Badaniem objęto grupę 43 osób w momencie rozpoznania PBL, hospitalizowanych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach, przed wdrożeniem leczenia, spełniających podstawowe kryteria rozpoznania wg. NCI-Working Group [13] (Tab. I).

Material do badań

Badanie prowadzono na komórkach krwi obwodowej pobranej do probówek zawierających: werseanian potasowy (EDTA-KE) (do badań immunotypowych) oraz heparynę sodową (do badań aberracji cytogenetycznych).

Badanie fenotypu komórek PB

Ekspresję antygenów błonowych badano metodą cytometrii przepływowej na komórkach krwi z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (anty-CD19PC-5, anty-CD5FITC, anty-CD20PE, anty-CD23PE, anty-CD79bPE, anty-CD22PE, anty-sIgFITC, anty-kappaPE, anty-lambdaFITC). Ekspresję powierzchniową czynników rokowniczych (anty-CD38PE, anty-CD49dPE, anty-CD11cPE, anty-CD54PE) analizowano w populacji komórek białaczkowych (CD5+19+). Jako dodatnie traktowano wyniki powyżej 30% ekspresji antygenów CD38 [14], CD49d [15], CD11c [16], CD54 [17, 18]. Stosowano kontrole izotopowe odpowiednie dla poszczególnych przeciwciał. Badania były przeprowadzone i analizowane metodą trzykolorowej fluorescencji, z wykorzystaniem cytometru przepływowego EPICS-XL-MCL i programu System II firmy Beckman-Coulter.

Ocena ekspresji ZAP-70 metodą immunocytochemii (ICCH)

Preparaty cytologiczne uzyskiwano przez izolację komórek jednojądrzastych na gradiencie (Ficoll Paque Premium, GE Healthcare Formerly Amersham, Bioscience), a następnie wykonywano preparaty cytospinowe za pomocą wirówki cytologicznej i utrwalano je. Do oznaczenia ekspresji ZAP-70 użyto przeciwciała mysiego (ZAP-70 klon 2F3.2, Dako), Barwienie immunocytochemiczne wykonano z użyciem polimeru znakowanego peroksydazą chrzanową sprzężoną z anty-mysią IgG i następnie DAB+ chromogen (roztwór 3,3'-diuaminobenzydyny) oraz hematoxyliną (DAKO) [19]. Jako dodatnie traktowano wyniki powyżej 20% ekspresji ZAP-70 wśród komórek B [10,11]. Prowadzono równocześnie ocenę ekspresji ZAP-70 metodą cytometrii przepływowej, a porównanie wyników będzie przedmiotem przygotowywanego opracowania.

Badania aberracji cytogenetycznych metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

Komórki krwi obwodowej poddano krótkotrwałej hodowli komórkowej (24–48h) w sterylnych naczyniach hodowlanych, w podłożu RPMI1640, z dodatkiem 20% surowicy płodowej cielęcej oraz mitogenu (Lectin). Hodowle zatrzymywano kolcemidem o końcowym stężeniu 0,2 µg/ml hodowli, komórki utrwalano. Po wysuszeniu preparatów w temperaturze pokojowej przeprowadzano hybrydyzację, zgodnie z protoko-

Tabela I. Szczegółowa charakterystyka kliniczna pacjentów

Table I. Detailed clinical characterization of patients

N	43
Wiek (w latach)	60 (23–83)
Płeć (M/K)	24/19
Leukocyty w momencie diagnozy (G/l)	20 (6,1–183)
Płytki < 100 (G/l)	5 (12%)
Hemoglobina < 11 g/dl	3 (7%)
Stężenie β_2 -mikroglobuliny > normy	13 (30%)
Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) > normy	10 (23%)
Białko C-reaktywne (CRP) > normy	3(7%)
Powiększenie śledziony	20(47)%
Powiększenie wątroby	12(30%)
Stadium kliniczne wg Rai: 0/I/II/III/IV	5(12%)/14(32%)/18(42%)/1(2%)/5(12%)
Stadium kliniczne wg Bineta: A/B/C	22(51%)/17(40%)/4(9%)
del(11q22-23)	6 (14%)
del(17p)	3(7%)
trisomia 12	5 (12%)
del(13q14)	17(40%)
CD38>30%	17 (40%)
ZAP-70 ICCH dodatni	29(67%)

łem Vysis, stosując sondy: LSI p53/LSI ATM i LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12. Analizowano 150–300 jąder interfazowych z wykorzystaniem programu ISIS (MetaSystems).

Statystyczne opracowanie wyników

Uzyskane wyniki analizowano za pomocą programu Statistica 5.0. W analizie zastosowano test Manna-Whitneya oraz współczynnik korelacji rang Spearmana. Jako poziom znamienności statystycznej uznano wartość $p \leq 0,05$.

Wyniki

Pośród 43 chorych dodatnią ekspresję antygenów CD49d, CD11c i CD54 (powyżej 30% ekspresji oznaczanej w populacji komórek białaczkowych CD5+19+) wykryto u odpowiednio: 30%, 33,3% i 69,8% pacjentów.

Uzyskano znamienne większą częstość występowania antygeny CD49d+ w grupie chorych w stadium Rai III/IV vs 0/II ($p=0,00026$). Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją antygenów CD 11c i CD54 a stopniem zaawansowania Rai.

W przeprowadzonej analizie wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD38 i CD49d ($p=0,001$). Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją CD38 a ekspresją CD11c i CD54.

Wykazano korelację pomiędzy cytoplazmatyczną ekspresją ZAP-70 a ekspresją CD49d ($p=0,01$). Uzyskano także dodatnią korelację pomiędzy ekspresją ZAP-70 oznaczanego metodą ICHH a ekspresją CD38 ($p=0,027$). Podczas analizy wyników stwierdzono, że 85,7% pacjentów CD11c(+) ($n=14$) wykazuje dodatnią ekspresję ZAP-70. Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją ZAP-70 a ekspresją CD54.

Analizując jednak pacjentów ZAP-70+, stwierdzono, że w tej grupie aż w 87% przypadków wykazuje obecność przynajmniej 1 z 3 czynników ryzyka badanych metodą cytometrii przepływową (CD38, CD49d, CD11c) (Tab. II).

Aż 90,9% pacjentów CD38(-) i równocześnie CD49d(+) i/lub CD11c(+) wykazuje dodatnią ekspresję ZAP-70.

Tabela II. Częstość występowania czynników ryzyka CD38, CD49d i CD11c w grupie pacjentów ZAP-70+

Table II. The frequency of prognostic factors CD38, CD49d and CD11c in group of patients ZAP-70+

Liczba czynników ryzyka CD38+/CD49d+/CD11c	Częstość występowania (liczba przypadków)
0	13,0 % ($n=4$)
1	41,0% ($n=12$)
2	37,9% ($n=11$)
3	3,9 % ($n=2$)

Brak jest korelacji badanych antygenów ze zmianami cytogenetycznymi związanymi z gorszym rokowaniem dla PBL, tj. delecją 17p i 11q, co wynika z małej liczebności grupy ($n=9$). Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, że u wszystkich chorych, u których wykryto delecję 17p, stwierdzono ekspresję ZAP-70 powyżej 20%.

Omówienie

Na skutek rozwoju technik badawczych, szczególnie cytogenetyki i biologii molekularnej, odkrywany jest cały szereg nowych czynników biorących udział w patogenezie PBL, a także badana jest ich przydatność rokownicza i predykcyjna. Niestety, wysokie koszty związane z wysokospecjalistycznym laboratorium dysponującym nowoczesnym, drogim sprzętem oraz czasochłonność metod stanowią istotne ograniczenia dla stosowania tych badań w codziennej praktyce klinicznej. Wielokolorowa cytometria przepływowa, dzięki której wykrywana jest ekspresja antygenów powierzchniowych [20], w tym badanych cząstek adhezyjnych [21] oraz CD38 [6], jest metodą bardziej dostępną dla codziennej praktyki klinicznej. Oznaczanie jednak cytoplazmatycznej ekspresji ZAP-70 metodą cytometrii przepływowej nadal znajduje się na etapie standaryzacji. W badaniu przeprowadzonym w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach wykazano dodatnią korelację pomiędzy liczbą komórek z obecnością antygeny CD38 i liczbą CD49d+ limfocytów. Stwierdzono także korelację pomiędzy cytoplazmatyczną ekspresją ZAP-70 a ekspresją CD49d ($p=0,01$). Ponadto stwierdzono znamienne większą częstość występowania antygeny CD49d w grupie chorych w stadium Rai III/IV vs 0/II ($p=0,00026$). W grupie chorych wykazujących obecność delecji 17p ($n=3$) ekspresję CD49d stwierdzono tylko w jednym przypadku. Należy dodać, że wszyscy chorzy mający delecję 17p byli ZAP-70-pozytywni. Z wynikami tymi koresponduje rezultat badań Gattei i wsp. [15], którzy wykazali mocne znaczenie antygeny CD49d jako niezależnego czynnika prognozującego całkowite przeżycie (OS) i czas wolny od leczenia (TTT). Fakt ekspresji antygeny CD49d>30% wg Gattei i wsp. miał silniejszą wartość rokowniczą w porównaniu z wartością ekspresji CD38, ZAP-70, stanem mutacji IgV_H , sCD23, stężeniem β_2 -mikroglobuliny, stanem zaawansowania Rai oraz aberracjami chromosomowymi. Jednak w przypadkach o dobrym rokowaniu, ZAP-70(-) i IgV_H (+), obecność CD49d(+) nie wpływała na zmianę tego rokowania. W pracach Zuccherto i wsp. [22–24] przedstawiono, że grupa pacjentów wykazująca się współistnieniem CD38 i CD49d charakteryzowała się złym przeżyciem. Również dostarczono dowodów, że chorzy z wysoką ekspresją CD49d charakteryzowali się wysokim stopniem zaawansowania Rai [25]. Rossi i wsp.

[26] zawężili grupę badaną wyłącznie do pacjentów w stanie zaawansowania A wg Bineta. Obserwowali oni korelację ekspresji CD49d na komórkach białaczkowych z obecnością antygenu CD38, wysokim stężeniem LDH i β_2 -mikroglobuliny. W tej grupie ekspresja CD49d powyżej 30% była wskaźnikiem rokowniczym dla TTT, czasu wolnego od progresji i czasu podwojenia limfocytozy. Przeprowadzona przez nich analiza wielowariantowa również wskazała na mocne znaczenie ekspresji CD49d>30% dla prognozowania TTT.

Piśmiennictwo dostarcza niejednoznacznych danych dotyczących znaczenia CD11c i CD54 jako czynników rokowniczych oraz ich korelacji z innymi czynnikami prognostycznymi. Ekspresja antygenu CD11c na komórkach białaczkowych PBL jest przedmiotem kontrowersji i licznych dyskusji [27, 28]. Marotta i wsp. [29] stwierdzili stosunkowo słabą ekspresję CD11c w PBL, w porównaniu z białaczką włochatokomórkową i prolimfocytową. Dodatkowo wykazali, że ekspresja CD11c jest związana ze stadium choroby – we wczesnym stadium stwierdzili wyższą ekspresję. W badaniu Tefferi i wsp. [30] ekspresja CD11c nie korelowała zarówno ze stanem progresji choroby, jak i czasem wolnym od leczenia. Z drugiej jednak strony, poziom ekspresji CD11c może służyć do wyodrębnienia bardziej agresywnych form choroby [31]. Równie wyraźnie widać to w przypadku ekspresji antygenu CD54. Z jednej strony wysoka ekspresja CD54 koreluje z brakiem mutacji somatycznych *IgV_H* [32], a z drugiej niska ekspresja ma związek z przedłużoną medianą czasu wolnego od terapii ($p=0,004$), niską ilością leukocytów oraz niskim stężeniem LDH [17]. Punktem odcięcia była ekspresja CD54>30%. Pacjenci wykazujący tę cechę mieli krótszy TTT i OS. Analizując chorych, u których stwierdzono podwyższoną ekspresję CD54 (>30%), Bulian i wsp. [18] dowiedli, że jego znaczenie prognostyczne jako niezależnego wskaźnika złego rokowania jest większe niż CD38 i ZAP-70. Jednak w doniesieniu Jahrsdörfer i wsp. [33] został dowiedziony brak korelacji pomiędzy ekspresją CD54 a aberracjami cytogenetycznymi. Wydaje się interesujący fakt, że grupa badaczy skupiona wokół Antonelli Zucchetto, która stworzyła dla potrzeb stratyfikacji chorych specjalny *scoring system* oparty na badaniu ekspresji 6 antygenów błonowych mających znaczenie rokownicze w PBL metodą cytometrii przepływową [34], zakwalifikowała CD54 do grupy czynników o dobrym znaczeniu prognostycznym, razem z CD25 oraz CD62L. Jako pozytywną traktowano ekspresję CD54 powyżej 50%.

Pomimo braku korelacji pomiędzy ekspresją CD38 i ZAP-70 a ekspresją CD11c i CD54, na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że aż 87% pacjentów ZAP-70-pozytywnych wykazuje obecność przynajmniej 1 z 3 wskaźników badanych metodą cytometrii przepływową (CD38, CD49d, CD11c).

Analizując grupę chorych CD38(-) i równocześnie CD49d(+) i/lub CD11c(+), stwierdzono, że 90,9% z nich miało dodatnią ekspresję ZAP-70. Rassenti i wsp. [10] wykazali, że ZAP-70 jest najmocniejszym wskaźnikiem złego rokowania u pacjentów z PBL, a dane na temat ekspresji CD38 i stanu mutacji *IgV_H* nie poprawiają naszej zdolności do przewidzenia czasu do włączenia leczenia za wyjątkiem przypadków ZAP-70-negatywnych, w których CD38 i stan mutacji zyskują jednoznaczne znaczenie prognostyczne. Mała liczebność badanej przez nas grupy oraz niska częstość występowania zmian cytogenetycznych związanych ze złym rokowaniem [3] nie pozwoliła na wykonanie analizy statystycznej pomiędzy badanymi czynnikami ryzyka (CD49d, CD54, CD11c) a tymi aberracjami. Zaplanowane badania miały na celu poszerzenie panelu czynników prognostycznych badanych metodą immunofenotypową o ocenę ekspresji molekuł adhezyjnych. Publikacja zawiera wyniki badań pilotażowych. Mała grupa pacjentów i krótki czas ich obserwacji nie pozwalają na ocenę ich wpływu na wynik leczenia lub parametry przeżycia.

Wnioski

Podsumowując uzyskane przez nas wyniki badań, należy sądzić, że:

1. Częstość występowania ekspresji CD49d koreluje z klinicznymi (Rai) i fenotypowymi (CD38, ZAP-70) czynnikami ryzyka.
2. Uzasadnione jest kontynuowanie badań antygenu CD11c jako potencjalnego czynnika prognostycznego, gdyż stwierdzono, że 86% przypadków CD11c+ wykazuje dodatnią ekspresję ZAP-70.

Piśmiennictwo

1. Kopeć-Ślęzak J, Podstawka U. Limfocyty B w normie i w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Onkol Pol.* 2007;10:24–29.
2. Parker TS, Strout MP. Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors and Impact of Treatment. *Discovery Medicine.* 2011;1(11):115–123.
3. Palacz A, Korycka A. Diagnostyczne i rokownicze znaczenie badań cytogenetycznych w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol.* 2008;3:433–459.
4. Robak T, Błoński JZ, Wawrzyniak E i wsp. Activity of cladribine combined with cyclophosphamide in frontline therapy of chronic lymphocytic leukemia with 17p13.1/TP53 deletion: report from the Polish Adult Leukemia Group. *Cancer.* 2009;115:94–100.
5. Wołowicz D. Czynniki rokownicze i predykcyjne w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol.* 2009;40:209–223.
6. Dumble RN, Wasił T, Fais F i wsp. *IgV* gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1840–1847.

7. Hamblin TJ, Davies Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated *IgV_H* genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848–1854.
8. Maloum K, Davi F, Merle-Beral H i wsp. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;96:377–379.
9. Degan M, Bomben R, Bo MD i wsp. Analysis of IgV gene mutation in B cell chronic lymphocytic leukemia according to antigen-driven selection identifies subgroups with different prognosis and usage of the canonical somatic hypermutation machinery. *Br J Haematol*. 2004;126:29–42.
10. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ i wsp. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;119:1923–30.
11. Crespo M, Bosch F, Villamor N i wsp. Zap-70 expression as a surrogate of immunoglobulinvariable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2003;348:1764–1775.
12. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S i wsp. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and marked CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007;110:4012–4021.
13. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D i wsp. Leukemia IWoCL. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446–5456.
14. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE i wsp. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during course of disease. *Blood*. 2002;99:1023–1029.
15. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI i wsp. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111:865–873.
16. Molica S, Dattilo A, Mannella A i wsp. CD11c expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. A comparison of results obtained with different monoclonal antibodies. *Haematologica*. 1994;79:452–455.
17. Hjalmar V, Hast R, Kimby E. Cell surface expression of CD25, CD54, and CD95 on B- and T-cells in chronic lymphocytic leukaemia in relation to trisomy 12, atypical morphology and clinical course. *Eur J Haematol*. 2002;68:127–34.
18. Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A i wsp. High CD54 cell surface expression on B cell in chronic lymphocytic leukemia is independent predictor of poor outcome. 13th Congress of the European Hematology Association, June 12–15, 2008. *Haematologica*. 2008;93(1):213.Abs. 0527.
19. Slack GW, Wizniak J, Dabbagh L, Shi X, Gelebart P, Lai R. Flow cytometric detection of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: correlation with immunocytochemistry and Western blot analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:50–56.
20. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46:1221–1229.
21. Bairey O, Zimira Y, Rabizadeh E, Shaklai M. Expression of adhesion molecules on leukemic B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia patients with predominantly splenic manifestation. *The Israel Medical Association Journal*. 2004;6:147–151.
22. Zucchetto A, Sonogo P, Degan M i wsp. Surface-antigen expression profiling (SEP) in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): identification of markers with prognostic relevance. *J Immunol Methods*. 2005;305:20–32.
23. Zucchetto A, Sonogo P, Degan M i wsp. Signature of B-CLL with different prognosis by Shrunken centroids of surface antigen expression profiling. *J Cell Physiol*. 2005;204:113–23.
24. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M i wsp. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol*. 2006;207:354–363.
25. Eksioglu-Demiralp E, Alpdogan O, Aktan M i wsp. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*. 1996;10:1331–1339.
26. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM i wsp. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2008;93:1575–1579.
27. Hanson CA, Gribben TE, Schnitzer B i wsp. CD11c (LEU-M5) expression characterizes a B-cell chronic lymphoproliferative disorder with features of both chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood*. 1990;76:2360–2367.
28. Wormsley SB, Baird SM, Gadol N i wsp. Characteristics of CD11c+CD5+ chronic B-cell leukemia and the identification of novel peripheral blood B-cell subsets with chronic lymphoid leukemia immunophenotypes. *Blood*. 1990;76:123–130.
29. Marotta G, Raspadori D, Sestigiani C i wsp. Expression of the CD11c antigen in B-cell chronic lymphocytic disorders. *Leuk Lymphoma*. 2000;37:145–149.
30. Tefferi A, Bartholemai BJ, Witzig TE i wsp. Clinical correlations of immunophenotypic variations and the presence of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95:173–177.
31. Esther AEKF, Morado M, De Paz Arias R i wsp. CD11C (LEU-M5) expression in CLL patients: relationship with clinical and pathological features and possible influence on prognosis. 13th Congress of the European Hematology Association, June 12–15, 2008. *Haematologica*. 2008;93(1):467. Abs.1199.
32. Sulda ML, Kuss BJ, Hall RK, Bailey S, Macardle PJ. The clinical utility of molecular and flow cytometric markers in CLL. *Intern Med J*. 2010;40:139–149.
33. Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Link BK, Weiner GJL. Good prognosis cytogenetics in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated in vitro with low susceptibility to apoptosis and enhanced immunogenicity. *Leukemia*. 2005;19:759–66.
34. Zucchetto A, Sonogo P, Degan M i wsp. Surface-antigen expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia: from the signature of specific disease subsets to the identification of markers with prognostic relevance. *J Transl Med*. 2006;1:4–11.